

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/FR05/000344

International filing date: 14 February 2005 (14.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: FR

Number: 0401474

Filing date: 13 February 2004 (13.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 25 April 2005 (25.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 15 FEV. 2005

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 1/2

BR1

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 @ W / 030103

REMISSION DES PÉCES	10 FEV 2004
DATE	75 INPI PARIS 34 SP
LIEU	0401474
N° D'ENREGISTREMENT	
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	
DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE	13 FEV. 2004
PAR L'INPI	
Vos références pour ce dossier (facultatif) B0253FR	

Confirmation d'un dépôt par télécopie											
2 NATURE DE LA DEMANDE <table border="1" style="float: right; width: 100px;"> <tr><td colspan="2">Cochez l'une des 4 cases suivantes</td></tr> <tr><td><input checked="" type="checkbox"/></td><td></td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td></td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td></td></tr> <tr><td><input type="checkbox"/></td><td></td></tr> </table>		Cochez l'une des 4 cases suivantes		<input checked="" type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
Cochez l'une des 4 cases suivantes											
<input checked="" type="checkbox"/>											
<input type="checkbox"/>											
<input type="checkbox"/>											
<input type="checkbox"/>											
Demande de brevet Demande de certificat d'utilité Demande divisionnaire <i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i> Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>	<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie <input type="checkbox"/> N° <input type="checkbox"/> N° <input type="checkbox"/> N°										
Date <input type="text"/> : <input type="text"/> / <input type="text"/> : <input type="text"/> / <input type="text"/> Date <input type="text"/> : <input type="text"/> / <input type="text"/> : <input type="text"/> / <input type="text"/> Date <input type="text"/> : <input type="text"/> / <input type="text"/> : <input type="text"/> / <input type="text"/>											
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)											
Liquides extrapaléaux de mollusques, obtention, formulation et utilisation											
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ											
OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE											
Pays ou organisation Date <input type="text"/> : <input type="text"/> / <input type="text"/> : <input type="text"/> / <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> : <input type="text"/> / <input type="text"/> : <input type="text"/> / <input type="text"/> N° Pays ou organisation Date <input type="text"/> : <input type="text"/> / <input type="text"/> : <input type="text"/> / <input type="text"/> N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »											
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)											
<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique											
Nom ou dénomination sociale Prénoms Forme juridique N° SIREN Code APE-NAF Domicile ou siège Rue Code postal et ville Pays Nationalité N° de téléphone (facultatif) Adresse électronique (facultatif)											
Société d'Innovation et de Recherche Appliquée S A (SIERA S A) Société Anonyme <input type="text"/> : <input type="text"/> / <input type="text"/> : <input type="text"/> / <input type="text"/> 266 avenue Daumesnil <input type="text"/> : <input type="text"/> / <input type="text"/> : <input type="text"/> / <input type="text"/> France Française N° de télécopie (facultatif)											
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé « Suite »											

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**
REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
 page 2/2

BR2

REMISE DES PIÈCES	Réervé à l'INPI
DATE	15 FÉV 2004
LIEU	75 INPI PARIS 34 SP
N° D'ENREGISTREMENT	
0401474	
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	

DB 540 W / 210502

6 MANDATAIRE (S'il y a lieu)		
Nom		TEZIER HERMAN
Prénom		Béatrice
Cabinet ou Société		BECKER & ASSOCIES
N °de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	35 rue des Mathurins
	Code postal et ville	75008 Paris
	Pays	France
N° de téléphone (facultatif)	01 53 43 85 00	
N° de télécopie (facultatif)	01 53 43 85 05	
Adresse électronique (facultatif)	becker@becker.fr	
7 INVENTEUR (S)		
Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques		
<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)		
8 RAPPORT DE RECHERCHE		
<input checked="" type="checkbox"/> Etablissement immédiat ou établissement différé		
<input type="checkbox"/> Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)		
<input type="checkbox"/> Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		
<input type="checkbox"/> Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt		
<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non		
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		
<input type="checkbox"/> Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG		
<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences		
<input type="checkbox"/> Le support électronique de données est joint <input type="checkbox"/> La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		
<input type="checkbox"/> Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
Béatrice TEZIER HERMAN CPI n°00-10000		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI 

LIQUIDES EXTRAPALLEAUX DE MOLLUSQUES, OBTENTION,
FORMULATION ET UTILISATION

La présente invention concerne un procédé d'obtention d'un liquide comprenant
5 l'extraction à partir d'un mollusque du liquide se situant entre la coquille et le corps
du mollusque, le liquide susceptible d'être obtenu par ce procédé, son utilisation
dans le domaine pharmaceutique, et notamment pour améliorer la cicatrisation
cutanée, pour régénérer les tissus, ou pour favoriser l'ostéogenèse ou la
minéralisation osseuse. Elle concerne également des compositions, en particulier
10 pharmaceutiques, des dispositifs médicaux ou des compléments alimentaires le
contenant.

Dans de nombreux cas de dégénérescence des tissus minéralisés, la réparation
tissulaire reste un problème complexe non encore résolu, notamment à cause de la
15 difficulté de mettre en œuvre des matériaux de substitution induisant une
régénération. Parmi ces matériaux de substitution induisant une régénération, la
nacre a déjà montré sa biocompatibilité, sa capacité ostéogénique et
ostéoinductrice vis-à-vis des ostéoblastes humains [Lopez et al., Tissue & Cell,
1992 : 667-679 ; Lamghari et al., J. Bone Miner. Res. 2001 ; 16 : 2232-2237].

20

Dans ce cadre, la nacre a permis de proposer des solutions efficaces dans des cas
particuliers. Ainsi, des implants fabriqués à partir de nacre ont été proposés pour
des réparations endo-osseuses. La nacre réduite en poudre a également été
suggérée comme matériau de comblement où elle montre alors des propriétés de
25 biodissolution ; on observe un remplacement progressif par de l'os néoformé
compact et spongieux suivant la nature de l'os receveur.

L'utilisation de la nacre comme biomatériaux n'est malheureusement pas toujours aisée ou possible dans de nombreux cas, par exemple lors de larges réparations locales de tissus dégénérés ou de pertes de substances.

5 Il n'existe donc pas à ce jour de biomatériaux aisément formulables et permettant de régénérer les tissus biologiques ou osseux de manière totalement satisfaisante.

A ce titre, la demanderesse vient de mettre au point une technique d'obtention du fluide extrapalléal se situant entre la coquille et le corps d'un mollusque par extraction dudit fluide (ou liquide). La demanderesse vient de mettre en évidence que le fluide ainsi obtenu peut conserver ses propriétés auto-organisantes et que ces dernières peuvent être utilisées, même dans un contexte externe à l'animal. En outre, ce fluide présente un grand intérêt industriel du fait de sa nature physique, puisqu'il peut se présenter sous de nombreuses formes, comme par exemple sous la forme d'un liquide, d'un film, d'un revêtement, de fibres ou encore sous la forme d'un matériau poreux. Ainsi, il peut facilement être manipulé et utilisé sous différentes formes, tout en gardant ses propriétés biologiques.

La présente invention vise donc un procédé d'obtention d'un fluide extrapalléal 20 comprenant la récupération du fluide extrapalléal se situant entre l'intérieur de la coquille et le corps d'un mollusque, en particulier le manteau dudit mollusque.

Elle a également pour objet le fluide susceptible d'être obtenu par ce procédé et son utilisation dans divers domaines. Le fluide obtenu est ainsi pur et pris dans son 25 intégralité, en particulier non modifié et non transformé, ultérieurement à la récupération, par un procédé modifiant ses qualités intrinsèques. Il peut être par la suite formulé, pour être en particulier utilisé dans une composition pharmaceutique, un dispositif médical ou des compléments alimentaires.

La composition pharmaceutique selon l'invention est en particulier destinée à améliorer les phénomènes de cicatrisation, à régénérer les tissus, biologiques ou osseux, favoriser l'ostéogénèse ou la minéralisation osseuse.

5 Chez l'animal, ce liquide participe *in situ* à la minéralisation de l'exosquelette. Certains voient une grande unicité des processus de minéralisation développés par la nature, depuis les exosquelettes des mollusques jusqu'à l'endosquelette des mammifères supérieurs. Le champ d'application de ces bioproduits est donc potentiellement très étendu, dans les domaines squelettiques, os et cartilage, dents,
10 ou tout autre tissu, en particulier la peau et ses phanères.

Selon l'invention, le procédé de préparation d'un liquide comprend donc une étape de récupération du fluide extrapalléal se situant entre la coquille et le corps d'un mollusque, en particulier le manteau dudit mollusque, ledit fluide ayant été extrait à
15 partir d'un mollusque.

Le fluide ainsi récupéré correspond à des sécrétions naturelles du mollusque qui se trouvent à la surface externe du manteau des mollusques du côté de la coquille. De manière surprenante, la demanderesse a constaté que ce liquide, même une fois
20 extrait et donc en dehors de son contexte naturel, pouvait être utilisé pour ses propriétés régénératrices et minéralisantes, et promouvoir ainsi la fabrication de la coquille (matière organominéralisée) d'un mollusque, et de façon plus large se substituer à, ou régénérer, des sécrétions de tout autre tissu connu pour former une matrice extracellulaire. Le liquide présente ainsi l'avantage de régénérer les tissus,
25 biologiques ou osseux, notamment en stimulant l'activité des cellules qui forment lesdits tissus ou en apportant les matériaux de base utiles à ladite régénération, et de favoriser l'ostéogénèse ou la minéralisation osseuse.

Par régénération de tissus, on entend la reconstruction et le renouvellement de tout
30 tissu ayant subi un dommage ou une altération (ou tissu lésé). Par minéralisation

(minéralisateur ou minéralisant), on entend l'action (capacité) qui consiste à apporter des éléments minéraux ou qui favorise la fixation des éléments minéraux sur de la matière organique. Par espèces minérales, on entend les cristaux, les atomes, les ions, les molécules contenant des éléments « minéraux » et/ou oligo-éléments, par opposition aux éléments organiques. Ainsi, la régénération d'un tissu biologique ou osseux consiste généralement à reconstruire ou renouveler en tout ou partie le tissu altéré, notamment grâce aux molécules de structure spécifique, aux molécules « signal » et aux éléments nourriciers organiques et/ou minéraux présents dans le liquide obtenu selon l'invention. En outre, aucune intolérance n'a été détectée lors de l'application du liquide ainsi extrait et/ou modifié ultérieurement sur ou dans un mammifère.

L'étape de prélèvement ou d'extraction du liquide est généralement réalisée de la manière suivante.

15 Le mollusque à partir duquel est extrait le liquide est généralement un mollusque mono- ou bi-valve, nacrier ou non, avantageusement nacrier. Les mollusques sont en particulier des huîtres et plus spécifiquement des huîtres du genre *Pinctada* et plus particulièrement du genre *Pinctada* espèce *margaritifera* ou *maxima*. Les huîtres peuvent être aussi choisies parmi celles du genre *Ostrea*, en particulier de l'espèce *edulis*, ou encore du genre *Crassostrea*, en particulier de l'espèce *gigas*. Il peut s'agir également de céphalopodes, comme par exemple le nautile, ou encore de gastéropodes, comme par exemple le bigorneau.

25 Le mollusque utilisé peut provenir d'un élevage aquacole ou terrestre. Le mollusque peut être sacrifié avant, pendant ou après le procédé selon l'invention. Il peut être utilisé mort ou vivant. Le mollusque par exemple peut être sacrifié avant le procédé selon l'invention, en prenant garde de conserver au moins partiellement (de préférence totalement) le liquide à extraire dans la coquille.

30 Le prélèvement du fluide extrapalléal peut être réalisé sur des lots de mollusques

exclusivement destinés à cet usage, sans nuire pour autant à leur intégralité. Les mollusques peuvent être éventuellement utilisés par la suite, ceux-ci restant saints et vivants.

5 De manière plus spécifique, le procédé ou l'étape d'extraction est une méthode non invasive. En effet, le liquide se situant entre l'intérieur de la coquille et le corps du mollusque, en particulier le manteau dudit mollusque, correspond à des sécrétions naturelles du mollusque qui se trouvent à la surface externe du manteau des mollusques du côté de la coquille et donc qui se trouvent à l'extérieur du corps du

10 mollusque proprement dit.

Afin d'accéder au liquide à extraire, le manteau du mollusque est de préférence décollé en tout ou partie. Lorsque le mollusque est bi-valve, au moins une des deux valves est soulevée de manière à pouvoir accéder au corps du mollusque,

15 préalablement à l'extraction.

Le décollement (ou séparation) du liquide de la coquille peut être réalisé manuellement, généralement à l'aide d'un outil approprié (comme par exemple : racloir ou spatule souple). Selon une autre méthode, éventuellement en complément dudit décollement manuel, le décollement du liquide de la coquille est

20 réalisé chimiquement. Ainsi, une réaction enzymatique, avantageusement non dénaturante, et généralement à température ambiante, peut aussi être mise en œuvre de façon à séparer, plus finement, le liquide de la coquille. De préférence, cette réaction enzymatique est réalisée en présence d'au moins une protéase, telle que par exemple la trypsine. La réaction peut ensuite être stoppée par une anti-protéase ou par simple dilution.

25

Le liquide est alors prélevé à la surface de la coquille à l'aide d'un instrument approprié, notamment à l'aide d'une seringue (en particulier munie d'une aiguille).

Le liquide prélevé est avantageusement stérilisé ou décontaminé par toute méthode connue en soi, notamment par filtration, par exemple sur filtre Millipore® (exemple : 30 0,20µm). Il peut être aussi déshydraté, notamment par lyophilisation. Le liquide peut

également être congelé, de préférence juste après la récupération ou après filtration.

5 Selon une variante du procédé, le prélèvement peut être effectué sur des mollusques vivants, par exemple lorsqu'il s'agit de gros mollusques, comme les bivalves nacriers de la famille des Pinctada.

10 Cette variante consiste de préférence à maintenir la coquille du bivalve vivant ouverte à l'aide d'un instrument, tel qu'une cale et/ou une pince forceps (ou écarteur). L'instrument est de préférence choisi de manière à ne pas blesser l'animal, en particulier il est choisi de manière à ne pas léser de façon irréversible son métabolisme. Le manteau est préférentiellement soulevé en tout ou partie pour le séparer d'au moins de l'une des coquilles.

15 Le liquide est alors prélevé à la surface de la coquille à l'aide d'un instrument approprié, tel que notamment racloir ou spatule souple. Avantageusement, un racloir (en plastique) est utilisé pour récolter le liquide se trouvant entre le manteau et la coquille. Alternativement, la récolte du liquide s'opère à l'aide d'une seringue généralement munie d'une aiguille, de préférence de diamètre compris entre 1 mm et 5 mm. Bien entendu, tout autre matériel adapté à la récolte du liquide peut être 20 envisagé.

25 Le procédé d'obtention du fluide selon l'invention peut comprendre en outre des étapes ultérieures non dénaturantes du fluide ainsi récupéré, telles que des étapes de filtration, de décontamination, de stérilisation, de congélation/décongélation, de modifications de viscosité, et/ou de mises en formes variées.

30 Le liquide obtenu selon la méthode décrite ci-dessus peut être utilisé tel que, à l'état pur (pris dans son intégralité), en particulier il est non modifié et non transformé, ultérieurement à la récupération, par un procédé modifiant ses qualités intrinsèques (étapes dénaturantes), notamment par un procédé de déminéralisation.

Le liquide obtenu peut être formulé par la suite en fonction de son usage ultérieur. Ainsi, l'utilisation ultérieure du liquide peut nécessiter un mode de préparation adapté. Les expériences conduites avec le liquide ainsi récupéré montrent qu'il est 5 d'un maniement très souple et qu'il s'adapte très facilement à toutes sortes de contraintes liées à sa mise en oeuvre. Il peut ainsi subir plusieurs décongélation et re-congélation sans que ses propriétés biologiques en soient affectées. Il en est de même pour la lyophilisation. Bien entendu, l'homme du métier veillera à ne pas modifier les qualités intrinsèques du liquide ainsi extrait et évitera donc de faire 10 subir à ce liquide toute opération nuisant à son intérêt, tel qu'une opération de déminéralisation.

Il est également possible de varier la viscosité du liquide ainsi obtenu en modifiant sa concentration en eau. On peut y incorporer un gélifiant ou tout autre substance 15 facilitant son utilisation ultérieure, pour le rendre plus ou moins liquide (visqueux).

Le fluide peut par exemple être mis sous forme de film ou de revêtement. Toute méthode connue en soi pour mettre sous forme de film ou de revêtement un liquide peut être mise en oeuvre. Il peut par exemple être étalé sur une surface lisse ou 20 poreuse ou tout autre support et former un film (caractère filmogène du fluide obtenu). Le film ou revêtement ainsi formé conserve le caractère régénérant et cicatrisant du liquide. Il peut constituer ainsi un film biologique organique en surface, avec un pouvoir minéralisant. L'épaisseur du film peut varier dans une large mesure en fonction de son usage final. Un film épais peut être par exemple 25 obtenu avec la triple propriété : (i) étanchéité, (ii) structure auto-supportée, (iii) apport minéral intrinsèque, tout en présentant le caractère régénérant et cicatrisant. Ce matériau, constitué par une association intime entre matière organique et matière minérale, forme un film sur toute surface et cristallise de façon polymorphe suivant l'état et la texture de la surface. Le film ainsi obtenu peut être utilisé sur son 30 support ou être retiré du support pour un usage ultérieur.

Le liquide peut aussi être utilisé ultérieurement sous forme de fibres. Toute méthode connue en soi pour mettre sous forme de fibres un liquide peut être mise en oeuvre. Ce liquide présente en effet l'avantage d'être filable dans un domaine large de viscosités. En particulier, une technique très simple d'étirement, notamment à l'aide d'une pince brucelles, permet d'étirer des fibres à partir du liquide. Il est possible de cette manière de l'utiliser *in situ* (localement) ou d'une autre manière, comme matériau de comblement poreux, invasif, pour remplir selon le besoin un volume donné. Le caractère invasif de ce matériau permet notamment à des matériaux biologiques, tels que des cellules, d'y pénétrer et d'y exercer leurs effets en association avec les propriétés du liquide mis en forme. Le même matériau peut être utilisé pour poncer deux berges tissulaires éloignées. Le même principe peut s'appliquer sur de très gros volumes, notamment par enduction de fibres d'une autre nature chimique (par exemple des fibres de carbone). Les fibres ainsi enduites présentent un revêtement à leur surface comprenant les éléments constitutifs du liquide selon l'invention et peuvent être utilisées pour assurer par exemple une interface cicatrisante.

Le fluide peut ainsi se présenter sous différentes formes, incluant liquide, films, revêtements et fibres. Selon la mise en forme désirée, il peut également se présenter sous forme d'un matériau poreux, notamment en utilisant, lors de sa mise en forme, un support poreux. Le matériau poreux peut être un film, un revêtement ou se présenter sous tout autre forme, tel qu'une forme sphérique.

Le fluide selon l'invention comprend généralement un mélange des éléments constitutifs de la matière vivante, en particulier un mélange de protéines, de proteoglycans, de polysaccharides, de lipides et de sels minéraux, ceci est plus particulièrement le cas pour un mollusque nacrier, avantageusement une huître du genre *Pinctada* (généralement prise dans son biotope naturel). La nature et la quantité de ces éléments peuvent varier dans une large mesure, notamment en

fonction du mollusque, de son biotope, de la saison du prélèvement et des conditions du prélèvement.

Pour donner un ordre de grandeur, ces éléments ont été analysés dans un liquide 5 donné (huître adulte du genre *Pinctada* prise dans son biotope naturel). La composition de ce liquide comprend de préférence au moins les composés suivants : des protéines en quantité moyenne de 0,5 mg/mL, des proteoglycane en quantité moyenne de 3 mg/mL, des polysaccharides en quantité moyenne de 1,5 mg/mL, des lipides en quantité moyenne de 1mg/mL et des sels minéraux en 10 quantité moyenne de 7,5 mg/mL.

Une analyse quantitative des oligo-éléments présents dans un liquide spécifique (identique à celui identifié ci-dessus) selon l'invention a été réalisée, en particulier en mesurant quantitativement les oligo-éléments présents par analyse² par 15 activation neutronique (AAN) et spectrométrie de masse couplée à une torche à plasma (ICP-MS). La composition de ce liquide (directement obtenu : sans déshydratation et modification ultérieure) comprend de préférence les oligo-éléments choisis parmi : S, Mg, La, Zn, Br, Ce, Fe, Mn, Cl, Cu, K, Sr, Na et Ca. De préférence, les quantités de ces oligo-éléments sont respectivement les suivantes : 20 0,02 ; 2 ; 0,28 ; 0,4 ; 1,78 ; 5,5 ; 13,6 ; 50 ; 296 ; 143 ; 582 ; 1000 ; 5420 (exprimés en µg/g) et 38,8 (exprimés en µg/100g).

Une analyse quantitative des acides aminés présents sous forme libre ou lié dans un fluide selon l'invention a été réalisée, en particulier en mesurant quantitativement 25 les acides aminés présents par l'analyseur d'acides aminés Beckmann 6300 utilisant la méthode classique à la ninhydrine. Le résultat de cette analyse est donné à la figure 1 (% en poids d'acides aminés par rapport au poids total d'acides aminés).

30 La présente invention a aussi pour objet le fluide susceptible d'être obtenu par le

procédé tel que décrit-avant. Le liquide (ou fluide) peut être non seulement le liquide obtenu directement après l'étape de récupération décrite ci-dessus, mais aussi celui obtenu après des étapes ultérieures non dénaturantes, telles que des étapes de filtration, de décontamination, de stérilisation, de congélation/décongélation, de 5 modifications de viscosité, et/ou de mises en formes variées, telles que notamment celles identifiées ci-dessus.

Plus particulièrement, le fluide selon l'invention est utilisé à titre de médicament.

10 La présente invention a également pour objet une composition, en particulier pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend le fluide tel que défini ci-dessus, en particulier en association avec un excipient pharmaceutiquement acceptable.

15 Le liquide utilisé à titre de médicament ou dans la composition détaillée ci-dessous peut être celui obtenu directement après l'étape de récupération décrite ci-dessus, mais aussi celui obtenu après des étapes ultérieures de filtration, de décontamination, de stérilisation, de congélation/décongélation, de modifications de viscosité, et/ou de mises en formes variées, telles que notamment celles identifiées 20 ci-dessus.

L'administration de la composition pharmaceutique ou du médicament selon l'invention peut être effectuée par voie topique, entérale ou parentérale. De préférence, la composition pharmaceutique est conditionnée sous une forme 25 convenant à une application par voie topique, c'est à dire appliquée *in situ* à l'endroit où le tissu est lésé.

Par voie entérale, la composition pharmaceutique peut se présenter sous forme de comprimés, de gélules, de dragées, de sirops, de suspensions, de solutions, de 30 poudres, de granulés, d'émulsions, de microsphères ou nano-sphères ou vésicules

lipidiques ou polymériques permettant une libération contrôlée. Par voie parentérale, la composition peut se présenter sous forme de solutions ou suspensions pour perfusion ou pour injection.

5 Selon un mode particulier de l'invention, la composition pharmaceutique est destinée à un usage local sur ou dans le tissu lésé. Ainsi, le support pharmaceutiquement acceptable est en particulier un excipient approprié à une application topique.

Par voie topique, la composition pharmaceutique selon l'invention est plus 10 particulièrement destinée au traitement des tissus mentionnés ci-dessus, en particulier au traitement de la peau et des os d'un mammifère, en particulier humain. Elle peut se présenter sous forme d'onguents, de crèmes, de laits, de pommades, de poudres, de tampons imbibés, de solutions, de gels, de sprays, de lotions ou de suspensions. Elle peut également se présenter sous forme de 15 microsphères ou nano-sphères ou vésicules lipidiques ou polymériques ou de patches polymériques et d'hydrogels permettant une libération contrôlée. Cette composition par voie topique peut se présenter sous forme anhydre, sous forme aqueuse ou sous la forme d'une émulsion (émulsion eau/huile, huile/eau ou émulsion multiple).

20

Le liquide selon l'invention est utilisé, de préférence par voie topique, à une concentration généralement comprise entre 0,02 % et 20 % en poids, de préférence entre 0,25 et 10 % en poids, et avantageusement entre 0,5 et 5 %, par rapport au poids total de la composition.

25

En particulier, la composition thérapeutique selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle contient, en association avec des excipients inertes, une quantité thérapeutiquement efficace du liquide selon l'invention, notamment pour améliorer la cicatrisation cutanée, pour régénérer les tissus, ou pour favoriser l'ostéogenèse 30 ou la minéralisation osseuse. Les tissus comprennent les tissus mous ou

squelettiques, incluant en particulier le squelette, les os, le cartilage, les dents, ou tout autre tissu, en particulier la peau et ses phanères. La composition selon l'invention permet de traiter en particulier les désordres osseux, cartilagineux ou dentaires.

5

L'invention réside également dans une méthode pour améliorer la cicatrisation cutanée, pour régénérer les tissus, notamment ceux identifiés ci-dessus, ou pour favoriser l'ostéogenèse ou la minéralisation osseuse, comprenant l'administration à des sujets nécessitant d'un tel traitement d'une quantité thérapeutiquement efficace 10 du liquide tel que défini précédemment.

10

Dans le contexte de l'invention, le terme « traitement » désigne le traitement préventif, curatif, palliatif, ainsi que la prise en charge des patients (réduction de la douleur, amélioration de la qualité de vie, ralentissement de la progression du 15 désordre, du traumatisme ou de la maladie), etc.

15

La méthode ou le traitement peut en outre être réalisé en combinaison avec d'autres ingrédients ou traitements, tels que notamment d'autres composés actifs pour améliorer la cicatrisation cutanée, pour régénérer les tissus, ou pour favoriser 20 l'ostéogenèse ou la minéralisation osseuse.

20

Les compositions pharmaceutiques ou médicaments selon l'invention peuvent comprendre en outre au moins un autre ingrédient thérapeutiquement actif, pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps.

25

Les compositions pharmaceutiques ou médicaments selon l'invention comprennent avantageusement un ou plusieurs excipients ou véhicules inertes, c'est à dire pharmaceutiquement inactifs et non toxiques. On peut citer par exemple des solutions salines, physiologiques, isotoniques, tamponnées, etc., compatibles avec 30 un usage pharmaceutique et connues de l'homme du métier. Les compositions

peuvent contenir un ou plusieurs agents ou véhicules choisis parmi les dispersants, solubilisants, stabilisants, conservateurs, etc. Des agents ou véhicules utilisables dans des formulations (liquides et/ou injectables et/ou solides) sont notamment la méthylcellulose, l'hydroxyméthylcellulose, la carboxyméthylcellulose, les 5 cyclodextrines, le polysorbate 80, le mannitol, la gélatine, le lactose, des huiles végétales ou animales, l'acacia, etc. Les compositions peuvent être formulées sous forme de suspension injectable, de gels, huiles, comprimés, suppositoires, poudres, gélules, capsules, etc., éventuellement au moyen de formes galéniques ou de dispositifs assurant une libération prolongée et/ou retardée. Pour ce type de 10 formulation, on utilise avantageusement au moins un agent tel que la cellulose, des carbonates ou des amidons.

Les compositions telles que décrites précédemment peuvent bien entendu en outre contenir des additifs pharmacodynamiquement actifs ou une combinaison de ces 15 additifs, et notamment : des agents mouillants, des émollients, des agents hydratants, comme le glycérol, le PEG 400 ou bien encore l'urée.

Ces compositions peuvent également contenir des agents d'amélioration de la saveur, des agents conservateurs tels que les esters de l'acide 20 parahydroxybenzoïque, les agents stabilisants, des agents régulateurs d'humidité, des agents régulateurs de pH, des agents modificateurs de pression osmotique, des agents émulsionnants, des antioxydants, tels que l'α-tocophérol, le butylhydroxyanisole ou le butylhydroxytoluène.

25 Bien entendu, l'homme du métier veillera à choisir le ou les éventuels composés à ajouter à ces compositions de telle manière que les propriétés avantageuses attachées intrinsèquement à la présente invention ne soient pas ou substantiellement pas altérées par l'addition envisagée.

30 L'administration peut être réalisée par toute méthode connue de l'homme du métier,

notamment par voie orale, topique ou par injection, typiquement par voie intra-péritonéale, intra-cérébrale, intra-thécale, intra-veineuse, intra-artérielle ou intramusculaire. L'administration par voie topique ou orale est préférée. S'agissant d'un traitement à long terme et non topique, la voie d'administration préférée sera

5 sublinguale, orale ou transcutanée.

Pour les injections, les composés sont généralement conditionnés sous forme de suspensions liquides, qui peuvent être injectées au moyen de seringues ou de perfusions, par exemple. Il est entendu que le débit et/ou la dose injectée, ou de

10 manière générale la dose à administrer, peuvent être adaptés par l'homme du métier en fonction du sujet à traiter, du désordre, du mode d'administration, etc.. Il est entendu que des administrations répétées peuvent être réalisées, éventuellement en combinaison avec d'autres ingrédients actifs ou tout véhicule acceptable sur le plan pharmaceutique (tampons, solutions saline, isotonique, en
15 présence d'agents stabilisants, etc.).

Selon un aspect particulier, l'invention concerne un dispositif, plus spécifiquement adapté à une injection sous-cutanée ou percutanée, comprenant le liquide tel que défini ci-avant et un excipient ou support physiologiquement acceptable. Ce

20 dispositif peut notamment être sous forme de seringues ou de perfusions.

Selon une variante, le dispositif médical de la présente invention peut être destiné à être implanté dans ou sur le corps d'un mammifère, le liquide tel que défini ci-avant pouvant se situer à l'intérieur d'une membrane adaptée à cette usage.

25 Selon un autre aspect particulier, l'invention concerne un complément alimentaire comprenant le liquide tel que défini ci-avant. Ce complément alimentaire est en particulier destiné à améliorer la cicatrisation cutanée, à régénérer les tissus, ou à favoriser l'ostéogenèse ou la minéralisation des os ou de la denture.

30 L'invention est utilisable chez les mammifères, en particulier chez l'être humain.

D'autres aspects et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

5 EXEMPLES

Exemple 1. Récupération du liquide à partir d'un animal sacrifié

Le mollusque est sacrifié de manière à ce que le liquide reste dans la coquille. On décolle avec précaution le manteau ; on utilise ensuite une réaction enzymatique 10 pour décoller complètement le liquide de la coquille. La réaction est ensuite stoppée par une anti-protéase. Le liquide est ensuite prélevé à la surface de la coquille. Aussitôt prélevé, le liquide peut être congelé. Il peut être stérilisé par filtration sur millipore 0, 20µm et être lyophilisé tout en conservant ses propriétés.

15 Exemple 2. Récupération du liquide à partir d'un animal vivant

Une huître de l'espèce de *Pinctada margaritifera* est entre-ouverte grâce à un écarteur suivant les pratiques bien connues de l'homme de l'art en perliculture. L'eau en excès encore présente est évacuée. L'animal est disposé de façon horizontale. Le manteau est délicatement séparé de la coquille inférieure à l'aide 20 d'une pince, puis le liquide est prélevé à l'aide d'une seringue, par exemple.

Pour le groupe 1 : taille moyenne: 77mm épaisseur moyenne : 26,12mm, on obtient 200 à 300 µL de liquide prélevé.

25 Pour le groupe 2 : taille moyenne: 85,2mm épaisseur moyenne : 25,6mm, on obtient 300 à 500 µL de liquide prélevé.

Pour le groupe 3 : taille moyenne: 104mm épaisseur moyenne : 36,9mm, on obtient 500 à 800 µL de liquide prélevé.

Pour le groupe 4 : taille moyenne: 108,6mm épaisseur moyenne : 36mm, on obtient 800 à 1000 µL de liquide prélevé.

Le liquide est :

5 - filtré
 - lyophilisé
 - quelques semaines plus tard, le liquide est reformé avec de l'eau stérile
 - il est étalé sous forme de film épais.

10

Exemple 3. Récupération du liquide à partir d'un mollusque non nacrier

Une huître de l'espèce *Ostrea edulis* est sacrifiée. Sa coquille est ouverte par cisaillement du muscle sans séparer les valves (par exemple à 60° l'une de l'autre).

15 L'huître est fixée et le manteau est décollé. De cette manière, il est possible de récolter le liquide de la première valve. L'animal est ensuite retourné pour opérer sur l'autre face. Dans ce cas, une quantité de 50 à 100µL par valve est obtenue.

Le liquide récolté sur une population d'une vingtaine d'animaux subit un conditionnement similaire à celui de l'exemple 2.

20 Le liquide est :

- filtré
- lyophilisé
- quelques semaines plus tard, le liquide est reformé avec de l'eau stérile
- il est étalé sous forme de film épais

25

On constate que le liquide se reconstitue même après lyophilisation, qu'il forme un film sur un support de polypropylène. Ce film se solidifie par auto-organisation et auto-cicatrisation.

30 L'examen au microscope optique montre qu'il est composé d'une fraction organique et d'une fraction minérale.

REVENDICATIONS

5

1. Procédé d'obtention d'un fluide extrapalléal, caractérisé en ce qu'il comprend la récupération du fluide extrapalléal se situant entre la coquille et le corps d'un mollusque, en particulier le manteau dudit mollusque.

10 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le mollusque à partir duquel est récupéré le fluide est un mollusque bivalve, avantageusement nacrier.

15 3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le mollusque est choisi parmi des huîtres et plus spécifiquement des huîtres du genre *Pinctada* et plus particulièrement de l'espèce *margaritifera* ou *maxima*, du genre *Ostrea*, en particulier de l'espèce *edulis*, ou du genre *Crassostrea*, en particulier de l'espèce *gigas*.

20 4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le mollusque à partir duquel est récupéré le fluide est un céphalopode, comme par exemple le nautilus, ou encore un gastéropode, comme par exemple le bigorneau.

25 5. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que, préalablement à la récupération, le manteau du mollusque est décollé en tout ou partie.

6. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que, préalablement à la récupération, lorsque le mollusque est bi-valve, au moins une des deux valves est soulevée de manière à pouvoir accéder au corps du mollusque.

30

7. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que, préalablement à la récupération, le décollement du fluide extrapalléal de la coquille est réalisé manuellement, généralement à l'aide d'un outil approprié.

5 8. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le fluide extrapalléal est récupéré à la surface de la coquille à l'aide d'un instrument approprié, tel que notamment racloir, spatule ou seringue.

9. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il 10 comprend en outre des étapes non dénaturantes du fluide ainsi récupéré, en particulier une ou des étapes de filtration, de décontamination, de stérilisation, de congélation/décongélation, de modifications de viscosité, et/ou de mises en formes variées.

15 10. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le fluide récupéré est stérilisé ou décontaminé.

11. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le fluide récupéré est déshydraté, notamment par lyophilisation.

20 12. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que le fluide récupéré est congelé, de préférence juste après la récupération ou après filtration.

25 13. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le fluide récupéré est mis sous forme de film ou de revêtement.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que le fluide récupéré est mis sous forme de fibres.

30

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que le fluide récupéré est mis sous forme d'un matériau poreux.

16. Fluide susceptible d'être obtenu par le procédé tel que défini dans l'une

5 quelconque des revendications précédentes.

17. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend le fluide défini dans la revendication précédente et un excipient pharmaceutiquement acceptable.

10

18. Composition selon la revendication précédente, destinée à améliorer la cicatrisation cutanée, à régénérer les tissus mous ou squelettiques, ou à favoriser l'ostéogenèse ou la minéralisation osseuse.

15 19. Composition selon la revendication 16, destinée au traitement des désordres osseux, cartilagineux ou dentaires.

20 20. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications précédentes 16 à 19, caractérisée en ce que le support pharmaceutiquement acceptable est un excipient approprié à une application topique, entérale ou parentérale.

21. Composition selon la revendication précédente, caractérisée en ce que le support pharmaceutiquement acceptable est un excipient approprié à une application topique.

25

22. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes 17 à 21, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un autre ingrédient thérapeutiquement actif pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps.

30

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que le fluide récupéré est mis sous forme d'un matériau poreux.

16. Fluide susceptible d'être obtenu par le procédé tel que défini dans l'une 5 quelconque des revendications précédentes.

17. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend le fluide défini dans la revendication précédente et un excipient pharmaceutiquement acceptable.

10

18. Composition selon la revendication précédente, destinée à améliorer la cicatrisation cutanée, à régénérer les tissus mous ou squelettiques, ou à favoriser l'ostéogenèse ou la minéralisation osseuse.

15

19. Composition selon la revendication 17, destinée au traitement des désordres osseux, cartilagineux ou dentaires.

20

20. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications précédentes 17 à 19, caractérisée en ce que le support pharmaceutiquement acceptable est un excipient approprié à une application topique, entérale ou parentérale.

21. Composition selon la revendication précédente, caractérisée en ce que le support pharmaceutiquement acceptable est un excipient approprié à une application topique.

25

22. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes 17 à 21, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un autre ingrédient thérapeutiquement actif pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps.

30

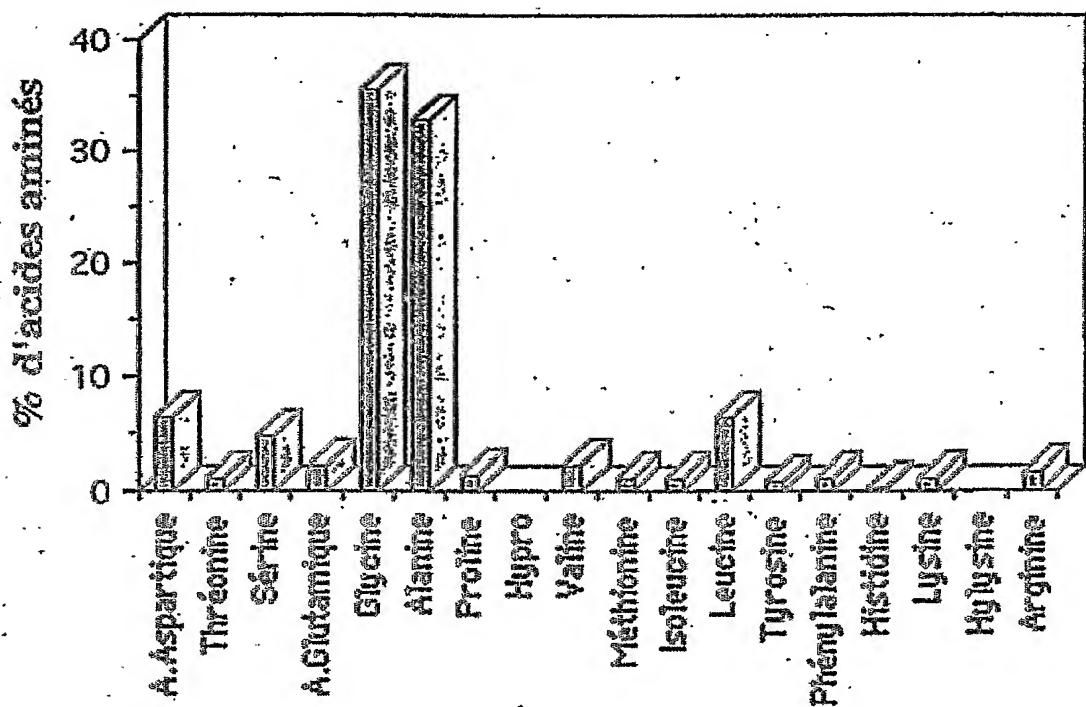
23. Fluide selon la revendication 16, à titre de médicament.

24. Dispositif comprenant le fluide tel que défini dans la revendication 16 et un excipient ou support physiologiquement acceptable.

5 25. Dispositif selon la revendication précédente, caractérisé en ce que sa forme est adaptée à une injection sous-cutanée ou percutanée, en particulier sous forme de seringue ou de perfusion.

10 26. Dispositif selon la revendication 24, caractérisé en ce que le fluide est à l'intérieur d'une membrane.

27. Complément alimentaire comprenant le fluide tel que défini à la revendication 16.





26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

INPI
INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
INPI
INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

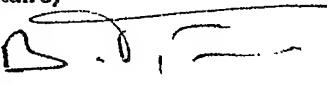
N° 11235*03

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../1...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 © W / 210103

Vos références pour ce dossier (facultatif)		B0253FR														
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL																
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)																
Liquides extrapalleaux de mollusques, obtention, formulation et utilisation																
LE(S) DEMANDEUR(S) :																
Société d'Innovation et de Recherche Appliquée S A (SIERA S A)																
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :																
<table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Nom</td> <td>LOPEZ</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td>Evelyne</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td>23 avenue de la Bourdonnais</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>[7 5 0 0 7] Paris</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Société d'appartenance (facultatif)</td> </tr> </table>			<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	LOPEZ	Prénoms		Evelyne	Adresse	Rue	23 avenue de la Bourdonnais	Code postal et ville	[7 5 0 0 7] Paris	Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	LOPEZ														
Prénoms		Evelyne														
Adresse	Rue	23 avenue de la Bourdonnais														
	Code postal et ville	[7 5 0 0 7] Paris														
Société d'appartenance (facultatif)																
<table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Nom</td> <td>BOURRAT</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td>Xavier</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td>39 rue de Patay</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>[3 3 0 0 0] Bordeaux</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Société d'appartenance (facultatif)</td> </tr> </table>			<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	BOURRAT	Prénoms		Xavier	Adresse	Rue	39 rue de Patay	Code postal et ville	[3 3 0 0 0] Bordeaux	Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	BOURRAT														
Prénoms		Xavier														
Adresse	Rue	39 rue de Patay														
	Code postal et ville	[3 3 0 0 0] Bordeaux														
Société d'appartenance (facultatif)																
<table border="1"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td>Nom</td> <td>ROUSSEAU</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Prénoms</td> <td>Marthe</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Adresse</td> <td>Rue</td> <td>6 rue du Nivernais</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>[2 9 2 0 0] Brest</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Société d'appartenance (facultatif)</td> </tr> </table>			<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	ROUSSEAU	Prénoms		Marthe	Adresse	Rue	6 rue du Nivernais	Code postal et ville	[2 9 2 0 0] Brest	Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	ROUSSEAU														
Prénoms		Marthe														
Adresse	Rue	6 rue du Nivernais														
	Code postal et ville	[2 9 2 0 0] Brest														
Société d'appartenance (facultatif)																
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.																
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)																
Paris, le 13 février 2004 																
Béatrice TEZIER HERMAN n°00-10000																

